



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE CERRO LARGO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - LICENCIATURA

CAMILO ALEXANDRE JABLONSKI

IMPACTO DO TRIFLUMURON SOBRE O ORGANISMO-MODELO *ZEBRAFISH*
(Danio rerio)

CERRO LARGO - RS

2018

CAMILO ALEXANDRE JABLONSKI

**O IMPACTO DO TRIFLUMURON SOBRE O ORGANISMO-MODELO *ZEBRAFISH*
(*Danio rerio*)**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de grau de
Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade
Federal da Fronteira Sul, campus de Cerro Largo.

Orientadora: Prof. Dra. Suzymeire Baroni

CERRO LARGO – RS

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Jablonski, Camilo Alexandre
Impacto do triflumuron sobre o organismo-modelo
zebrafish (Danio rerio) / Camilo Alexandre Jablonski. --
2018.
26 f.:il.

Orientadora: Doutora Suzyneire Baroni.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Ciências Biológicas-Licenciatura , Cerro Largo, RS ,
2018.

1. Micronúcleo. 2. Anormalidades Nucleares. 3.
Inseticidas. 4. Genotoxicidade. I. Baroni, Suzyneire,
orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III.
Título.

CAMILO ALEXANDRE JABLONSKI

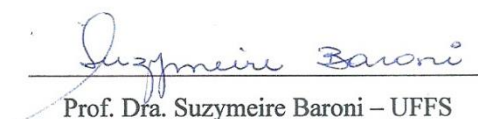
IMPACTO DO TRIFLUMURON SOBRE O ORGANISMO-MODELO ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)

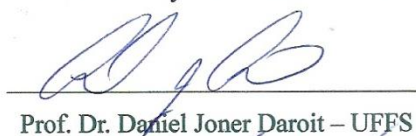
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Licenciado em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Fronteira Sul.

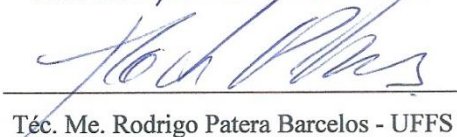
Orientadora: Dra. Suzymeire Baroni

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 26/11/2018

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Suzymeire Baroni – UFFS


Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS


Téc. Me. Rodrigo Patera Barcelos - UFFS

AGRADECIMENTOS

Para mim, esta vai ser a parte mais difícil desse trabalho, porque eu realmente sou péssimo em demonstrar afetividade e sensibilidade. Mas TCC sem agradecimentos não seria um TCC e, de qualquer forma, é sempre importante lembrar das pessoas que estão do nosso lado e que nos apoiaram em momentos críticos de nossas vidas.

Começo agradecendo, primeiramente, a meus pais. Foram quatro anos e meio de muito conflito, principalmente no quesito financeiro, mas apesar disso, sempre me apoiaram e me ajudaram em todos os aspectos para que eu pudesse chegar aonde estou. Além disso, eles sendo pequenos agricultores, sabem muito bem como é a vida no campo para os que não tem muitos hectares de terras, e não queriam a mesma para seus filhos. Por isso, sempre incentivaram para que eu estudasse e tivesse uma profissão. Ainda, agradeço imensamente por serem os pais que são, e que apesar da idade avançada, terem aceitado a minha orientação sexual e me amar do jeito que eu sou. Obrigado!

Quero agradecer a meus irmãos também que fazem parte da minha jornada desde sempre. Uns mais próximos a mim do que outros, mas os laços de sangue nos unem. Agradeço principalmente à minha irmã mais velha, a Simoni, pois ela sempre foi o meu modelo de profissional que eu queria seguir. Desde criança eu a vendo fazer magistério, depois graduação, depois sendo concursada, depois fazendo outra graduação, depois sendo aprovada em mais um concurso, depois voltando a exercer a docência, depois fazendo mestrado e enfim, sempre estudando e sempre mostrando que sem estudo não somos nada. Agradeço também ao meu cunhado, Tarcísio, marido da Simoni. Essa dupla é sensacional e não consigo imaginar minha formação identitária-partidária-ideológica sem eles. Por ele ser professor de História, sempre tive espaço dentro da família para discutir política e sociedade, e foram nessas discussões, que principalmente, eu não me tornei uma pessoa alienada. Agradeço minha irmã mais nova também, a Carine, por toda a amizade de jovens que construímos e toda a parceria e porres que tomamos logo que entramos na universidade, além de claro, ter sido a primeira pessoa da família que eu revelei ser homossexual e ter me apoiado. Obrigado a vocês!

Agradeço também ao meu parceiro, meu amigo, meu namorado, o Alexandre, que foi extremamente importante e essencial desde a metade da minha graduação até o momento. Sou um homem muito sortudo por ter achado ele na minha vida (obrigado Tinder, também). Agradeço por ter sido sempre tão paciente em todos os momentos ruins que tive durante esse tempo. Mesmo ele sendo das humanas, me acompanhou em vários dias até o laboratório para

alimentar os peixes, mesmo sob chuva ou muito sol. Agradeço por ser essa pessoa maravilhosa e que me apoia em tudo, me dando aquele ânimo e vendo o lado bom em mim, mesmo quando eu não posso ver. Obrigado por ser meu parceiro para todas as horas, desde as ruins até as ótimas. Não sei como seria meus últimos dois anos sem ti! Obrigado! <3

Agora saindo do âmbito familiar e entrando no âmbito acadêmico, quero agradecer a professora Suzy que foi peça essencial para que esse trabalho fosse realizado. Me apaixonei pelas aulas da profe Suzy na primeira vez que pude estar em uma mesma sala com ela, quando ela ministrava um minicurso sobre genotoxicidade em uma semana acadêmica do curso. Uma pessoa divertida, sempre alto astral, onde poucas vezes a vi de mau-humor e acima de tudo, sempre disposta a ajudar. E nesse sentido, só tenho a agradecer. Agradeço demais por ela ter ACREDITADO em mim, quando poucas pessoas em 2016 acreditavam, por eu estar perdido e não ter decidido o que eu seguiria após o final da graduação. Agradeço pela bolsa de iniciação científica que ela me proporcionou naquele ano, que mudou toda a minha trajetória acadêmica e fez eu me apaixonar pela pesquisa em laboratório. Hoje não tenho mais dúvidas de que quero seguir na área que escolhi, e foi graças a essa oportunidade que eu poderei ser um profissional totalmente realizado no futuro. Enfim, agradeço por todos puxões de orelha (principalmente quando era novato no lab.), todos os conselhos para a vida, todo o apoio e compreensão. Obrigado!

Agradeço também aos meus parceiros de laboratório que também ajudaram a executar esse TCC, desde 2016. O Rodrigo, técnico de Biologia da UFFS e esposo da profe Suzy, agradeço por ter me dado sua confiança para trabalhar no laboratório e até mexer nos seus equipamentos de medição dos parâmetros da água. Um gesto tão simples, mas pelo qual fiquei extremamente feliz (kkkk). No começo, eu tinha medo do Rodrigo, cara de mau e tal, mas com o passar do tempo, descobri que é uma pessoa super gente boa e sempre disposto a ajudar um novato na pesquisa. Agradeço também ao Natan pelas vezes que pôde me ajudar nos meus afazeres, mesmo com todo seu trabalho de dissertação para fazer. Obrigado!

Mais um parceiro de laboratório, que também não posso deixar de agradecer é o Fabrício. Hoje mestrando de Ecologia na UFRJ e muito meu amigo, onde foi nos laboratórios que construímos nossa amizade, principalmente quando era voluntário no lab. de genética. Lembro como se fosse hoje, eu começando a executar alguns protocolos sozinho e estávamos fazendo orceína acética. E eis que surge a grande ideia de aquecer o ácido acético no micro-ondas (porque na chapa de aquecimento era demorado demais kkk). Não foi preciso 1 minuto para que o béquer com ácido acético entrasse em ebulição no micro-ondas e explodisse

HAHAHA. Praticamente evaporou instantaneamente o ácido e todo o laboratório de genética ficou cheirando a vinagre. E não só o nosso lab, como todo o bloco de laboratórios. Foram muitos dias até que o cheiro de vinagre pudesse sair do laboratório e muitas lavagens para sair das roupas. Mas enfim, Fabrício foi crucial para meu amadurecimento científico, já que fazia parte desse âmbito há mais tempo. Agradeço por todos os conselhos, todas as ajudas no laboratório e nas escritas de texto e por todos os conselhos para o mestrado. Agradeço também por ter participado do seu primeiro porre. Obrigado!

Quero agradecer à banca que aceitou o meu convite para discutir o meu TCC. Rodrigo que já agradei anteriormente pela parceria no lab, e agora agradeço novamente por ter aceitado o convite para ser banca desse trabalho. Também agradeço ao professor Daniel, que aceitou fazer parte desta banca. Sempre quis que o professor Daniel fizesse parte da minha banca de TCC, pois sempre foi um professor que me desafiou a sempre dar o meu melhor em suas aulas. E nesse sentido, aproveito para agradecer pelas aulas espetaculares de Microbiologia Geral, Fundamentos da Imunologia e Parasitologia Básica, onde principalmente, pelas duas primeiras disciplinas pude conhecer um pouco mais sobre os seres microscópicos e também os mecanismos fantásticos de imunologia do nosso corpo. Agradeço por terem sido aulas maravilhosas onde pude aprender excelentemente todo o conteúdo para poder levar para a vida. Espero um dia ser metade do professor que você é. Obrigado!

E por último, mas não menos importantes, quero agradecer a todos meus amigos, que desde 2014 (alguns desde 2011, 2012, 2013) estiveram comigo em todos os momentos bons e ruins desta caminhada e que indiretamente, estiveram envolvidos neste trabalho: Bianca, Carol, Céli, Charles, Dani, Djonatan, Eliséte, Eloisa, Fabrício, Giulia, Jéka, Jéssika, Jo, Luíza, Maikel, Michely. Agradeço por toda a amizade e por todos os porres tomados nestes anos, por todo o companheirismo e as inúmeras histórias que temos para relembrar no futuro. Obrigado!

“Todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja veneno. A dose correta distingue o veneno do remédio.” (PARACELSO, 1493 – 1541)

RESUMO

Neste trabalho buscou-se avaliar a frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em eritrócitos de *zebrafish* (*Danio rerio*), por meio da exposição desta espécie a diferentes concentrações de triflumuron (Certero®), em testes agudos (96 horas) e crônico (30 dias). Nos testes agudos foram usadas as seguintes concentrações do inseticida: 0,2 mL/L; 0,6 mL/L e 1,8 mL/L. Nesses testes, houve mortalidade total dos peixes em menos de 24 horas de exposição ao inseticida. No tratamento crônico foi utilizada a concentração de 0,2 mL/L. Neste último não houve mortalidade de peixes antes do término do experimento, mas constatou-se por meio do teste estatístico que o triflumuron não aumentou as frequências de micronúcleos e anormalidades nucleares nas células sanguíneas destes animais.

Palavras-chave: Micronúcleo. Anormalidades nucleares. Inseticidas. Genotoxicidade.

ABSTRACT

In the present study, we aim to evaluate the frequency of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes from zebrafish (*Danio rerio*), by the exposure of this species to different concentrations of triflumuron (Certero®), in acute (96 hours) and chronic (30 days) tests. In acute treatments the following concentrations of insecticide were used: 0,2 mL/L; 0,6 mL/L e 1,8 mL/L. In this tests there was complete fish mortality within 24 hours of exposure to the insecticide. In the chronic treatment it was used the concentration of 0,2 mL/L. In this last test, there was no fish mortality before the end of the experiment, but through the statistical test it was verified that the triflumuron did not increase the frequencies of micronuclei and abnormalities in the blood cells of these animals.

Keywords: Micronucleus. Nuclear abnormalities. Insecticides. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplo de anormalidade nuclear do tipo “ <i>lobed</i> ” (seta a) e micronúcleo (seta b).	15
Figura 2 - Exemplo de célula binucleada (seta a) e AN “ <i>blebbed</i> ” (seta b).....	15
Figura 3 - Eritrócitos de peixe com AN do tipo “ <i>notched</i> ” (setas a) e micronúcleo (seta b)..	16
Figura 4 - Frequências absolutas de micronúcleos e anormalidades nucleares registradas em 20.000 eritrócitos (por aquário) de <i>zebrafish</i> mantidos no controle e tratamento crônico com triflumuron.....	18
Figura 5 - Variação de registros de anormalidades nucleares encontradas nos dois grupos de <i>zebrafish</i> do estudo, no Laboratório de Genética, UFFS campus de Cerro Largo - RS, em 2018.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da água nos aquários de controle, teste crônico e agudo. Laboratório de Genética, UFFS campus de Cerro Largo - RS, 2018.....	17
Tabela 2 – Médias dos valores de ocorrência de micronúcleos e anormalidades nucleares em <i>zebrafish</i> no aquário de controle e aquário de tratamento, no Laboratório de Genética da UFFS campus de Cerro Largo – RS, em 2018.	18

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 METODOLOGIA	13
2.1. Concentrações de triflumuron usadas nos testes	13
2.2 Monitoramento dos parâmetros da água e comportamentos dos peixes	13
2.3 Período de exposição dos grupos de peixes ao triflumuron e confecção dos esfregaços de sangue	14
2.4 Coloração dos esfregaços de sangue	14
2.5 Contagem dos eritrócitos e análise das observações	14
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS	23

1 INTRODUÇÃO

Desde 2008, o Brasil é considerado o país que mais faz uso de agrotóxicos em sua agricultura (CARNEIRO et al., 2015). À medida que a demanda mundial de alimentos cresce, o setor agrícola está cada vez mais dependente destas substâncias para alcançar altos patamares de produção. De acordo com a legislação brasileira, os agrotóxicos são definidos como substâncias físicas, químicas ou biológicas que servem para “defender” plantas ou animais de seres vivos considerados prejudiciais à agricultura, ambiente natural, urbano ou doméstico (BRASIL, 1989; BRASIL, 2002).

O triflumuron faz parte do grupo químico das benzo-fenil-ureias e é um inibidor da síntese de quitina pertencente à categoria da classe de inseticidas chamados reguladores do desenvolvimento de insetos (do inglês IGRs = *Insect Growth Regulator*) (WHO, 2006). Esse tipo de inseticida não possui como mecanismo primário a morte, mas atua no desenvolvimento normal do inseto – nesse caso, na síntese de quitina, que é o principal constituinte do exoesqueleto dos insetos – impedindo que a metamorfose aconteça corretamente, e consequentemente fique impossibilitado de chegar à fase adulta (BELINATO, 2007).

Para avaliar os efeitos genotóxicos de xenobióticos em organismos não-alvo, é de conhecimento científico fazer uso do teste de micronúcleo e anormalidades nucleares, que foi desenvolvido por Schmid em 1975 (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Já o estudo com peixes é uma metodologia adaptada por Hooftmann e Raat (1982) e consiste na coleta do sangue periférico de peixes e posterior análise de seus eritrócitos (CORT; GHISI, 2014). O micronúcleo é um núcleo “extra”, menor que o núcleo normal da célula, tendo aproximadamente 1/3 do seu tamanho e esse fenômeno acontece quando ocorre quebras de cromossomos (clastogenicidade) durante a anáfase da mitose, quando esses cromossomos são perdidos por não poderem se ligar às fibras do fuso e fazer sua migração normal aos polos da célula (LE BIHANIC et al., 2016). Além da presença de micronúcleos, é possível avaliar a presença de anormalidades nucleares, que se caracterizam por serem conformações anormais que o núcleo dos eritrócitos pode apresentar, mostrando que as células estão sofrendo algum tipo de resposta primária antes da formação do micronúcleo (THOMÉ; SILVA; SANTOS, 2016).

Neste trabalho foi usado o *zebrafish* como organismo para os testes realizados. O *zebrafish*, também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, é um pequeno peixe teleósteo (3 – 4 cm) de água doce da família Cyprinidae, sendo nativo do continente asiático

(SCHNEIDER, et al., 2009). Várias características do *zebrafish* tornaram esse organismo popular na pesquisa científica, como por exemplo, o seu tamanho reduzido – o que facilita a sua criação em biotérios e se torna economicamente mais viável –, sua rápida reprodução e desenvolvimento até chegar à fase adulta e seu genoma que é bastante similar ao dos mamíferos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012). Por causa dessa última característica, ele tem se tornado organismo-modelo frequentemente usado para avaliar o impacto que potenciais substâncias tóxicas podem acarretar sobre o genoma (SANT'ANNA, 2009) e por isso foi escolhido para este trabalho.

Diante do cenário do uso de agrotóxicos no Brasil, se torna importante o estudo dos impactos que essas substâncias podem acarretar nos seres vivos não-alvo e nesse sentido, o triflumuron é uma substância que possui estudos insuficientes sobre os danos que pode causar em outros organismos além dos insetos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do triflumuron (Certero®) sobre o organismo-modelo *zebrafish* (*Danio rerio*), por meio da análise das frequências de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos do sangue periférico dessa espécie.

2 METODOLOGIA

Os espécimes de *zebrafish* deste trabalho foram adquiridos no comércio local de Cerro Largo – RS, variaram entre 3 e 4 cm de comprimento e pesando em média 0,61 g. Foram trazidos ao laboratório, onde foram aclimatados por 72 horas, em aquários com capacidade de 15 L, com água de torneira previamente preparada¹, sendo 10 peixes por aquário. A metodologia usada foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) e aprovado com o protocolo 23205.000952/2017-89.

2.1. Concentrações de triflumuron usadas nos testes

Para cada aquário de testes agudos foram usadas as seguintes concentrações de Certero®²: 0,2 mL/L (= 3 mL) para a concentração recomendada de campo; 0,6 mL/L (= 9 mL) para a concentração tripla da concentração de campo; e 1,8 mL/L (= 27 mL) para a concentração tripla da anterior. A concentração de campo foi calculada a partir das recomendações de seu uso na agricultura de soja, descritas na bula do produto. Para o teste crônico foi usado o mesmo valor da concentração de campo (0,2 mL/L = 3 mL), sendo o valor total diluído em doses fracionadas durante 30 dias (0,3 mL por dia). Além disso, mais um aquário foi usado sem a adição do inseticida, sendo este o controle.

2.2 Monitoramento dos parâmetros da água e comportamentos dos peixes

Os animais foram monitorados durante o tempo de testes quanto ao seu comportamento (mobilidade) e alimentados três vezes ao dia. Além disso, o monitoramento dos parâmetros da água aconteceu diariamente³, onde buscou-se os parâmetros ideais da água dos aquários tendo como base o trabalho de Dammski et al. (2011).

¹ A água dos aquários ficou em repouso por pelo menos três dias para a decantação do cloro.

² As concentrações usadas neste trabalho referem-se a diluições do produto disponível comercialmente em sua suspensão concentrada (princípio ativo + outros ingredientes).

³ No aquário de controle e teste crônico.

2.3 Período de exposição dos grupos de peixes ao triflumuron e confecção dos esfregaços de sangue

Os peixes foram expostos para um período de 96 horas⁴ nos testes agudo e durante 30 dias para o teste crônico e controle. Terminado o período de exposição, os peixes foram anestesiados com óleo de cravo e posteriormente sacrificados por meio do corte do pedúnculo caudal, para a extração do sangue periférico⁵. Para coleta de sangue foram utilizados capilares de vidro com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), onde imediatamente após a coleta, fez-se a confecção de esfregaço de sangue em lâminas previamente limpas. Após a secagem do esfregaço em temperatura ambiente, as lâminas foram submersas em metanol absoluto por 10 minutos, para a fixação do material biológico.

2.4 Coloração dos esfregaços de sangue

As lâminas foram coradas em um período após 24 horas da fixação do material. A coloração seguiu o protocolo de Feulgen (hidrólise e posterior submersão em reativo de Schiff por duas horas) para a coloração do núcleo e contracoloração com *fast-green*, por 1 minuto, para evidenciar citoplasma. Após o protocolo de coloração ter sido realizado, as lâminas foram deixadas para secagem em temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

2.5 Contagem dos eritrócitos e análise das observações

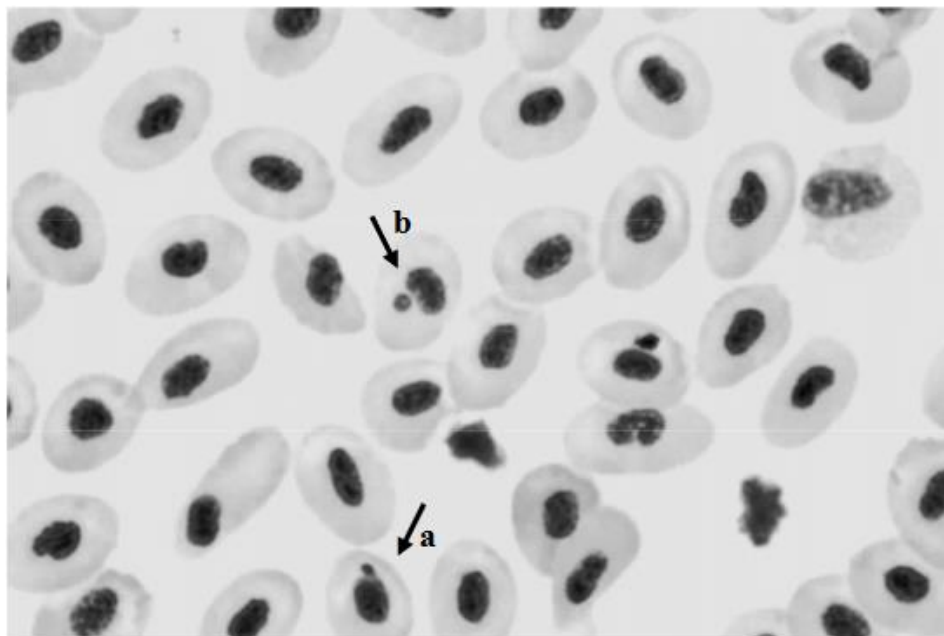
Depois da etapa de coloração das lâminas, procedeu-se com a contagem dos eritrócitos. De cada peixe foram contabilizadas 2.000 células, com microscópio óptico com aumento total de 1000x. Durante a contagem, foram observadas a presença de micronúcleos (MN) (Fig. 1 e 3) e anormalidades nucleares (AN), de acordo com Rivero (2007). As AN foram classificadas em cinco tipos: “*blebbed*” (Fig. 2), com evaginação leve do núcleo; “*lobed*” (Fig. 1), com evaginação maior e mais alterada que a anterior; “*notched*” (Fig. 3), quando a célula apresentava o seu núcleo com um corte considerável; binucleada (Fig. 2), quando o eritrócito apresentava dois núcleos aparentes, com aproximadamente o mesmo tamanho; e vacúolo, quando o núcleo apresentou uma cavidade dentro do limite nuclear. O núcleo dos eritrócitos foi considerado

⁴ Não foi possível serem completadas as 96 horas de experimento, porque todos os peixes expostos no tratamento agudo morreram antes do fim do período de teste.

⁵ Foi possível executar o protocolo de confecção de esfregaços somente com os peixes do aquário de controle e do teste crônico, visto que estes dois grupos completaram todo o período de experimento.

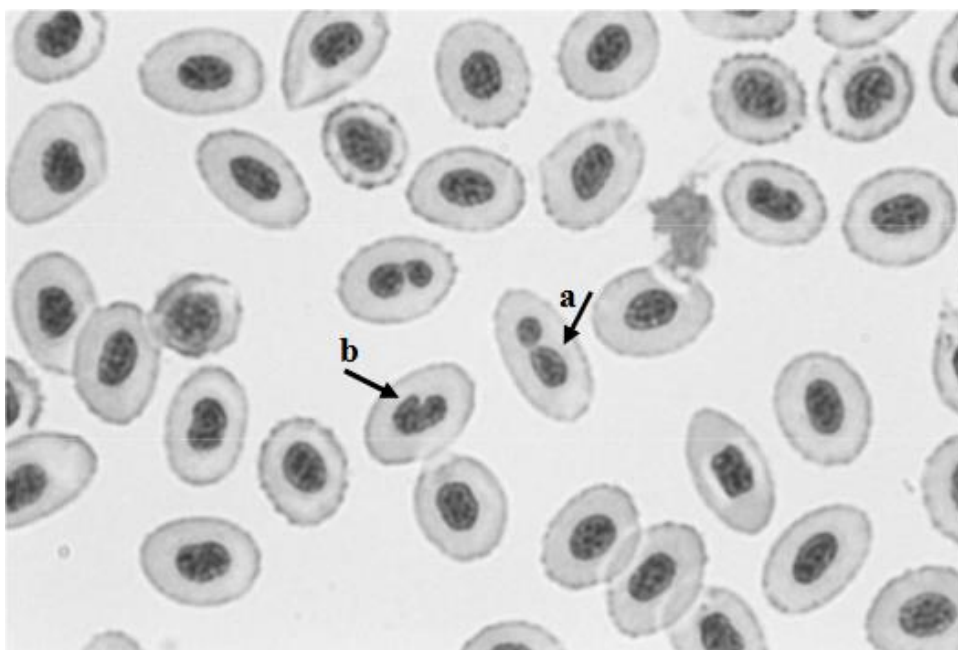
normal quando manteve o formato oval-arredondado, característico desse grupo de animais (MATOZO, 2015).

Figura 1 – Exemplo de anormalidade nuclear do tipo “lobed” (seta a) e micronúcleo (seta b).



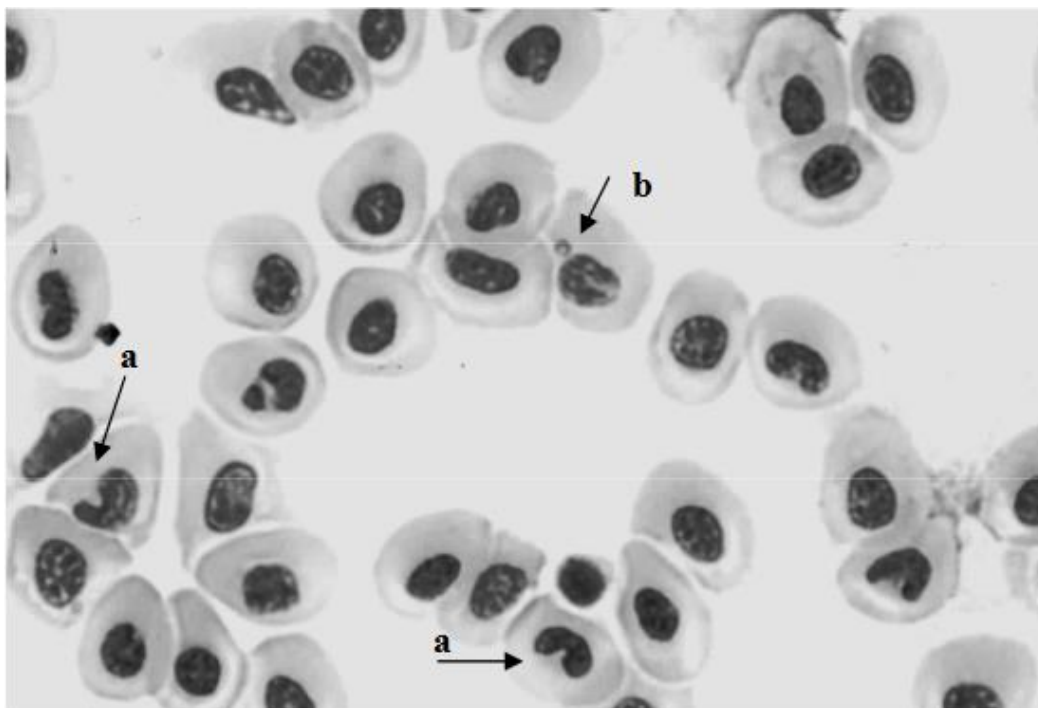
Fonte: Rivero, 2007.

Figura 2 - Exemplo de célula binucleada (seta a) e anormalidade nuclear do tipo "blebbed" (seta b)



Fonte: Rivero, 2007.

Figura 3 - Eritrócitos de peixe com anormalidade nuclear do tipo "*notched*" (setas a) e micronúcleo (seta b).



Fonte: Rivero, 2007.

Os resultados obtidos a partir das análises microscópicas foram submetidos ao teste de Wilcoxon (equivalente ao Teste U de Mann-Whitney) para dados não-paramétricos, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O software usado foi o R, interface RStudio.

3 RESULTADOS

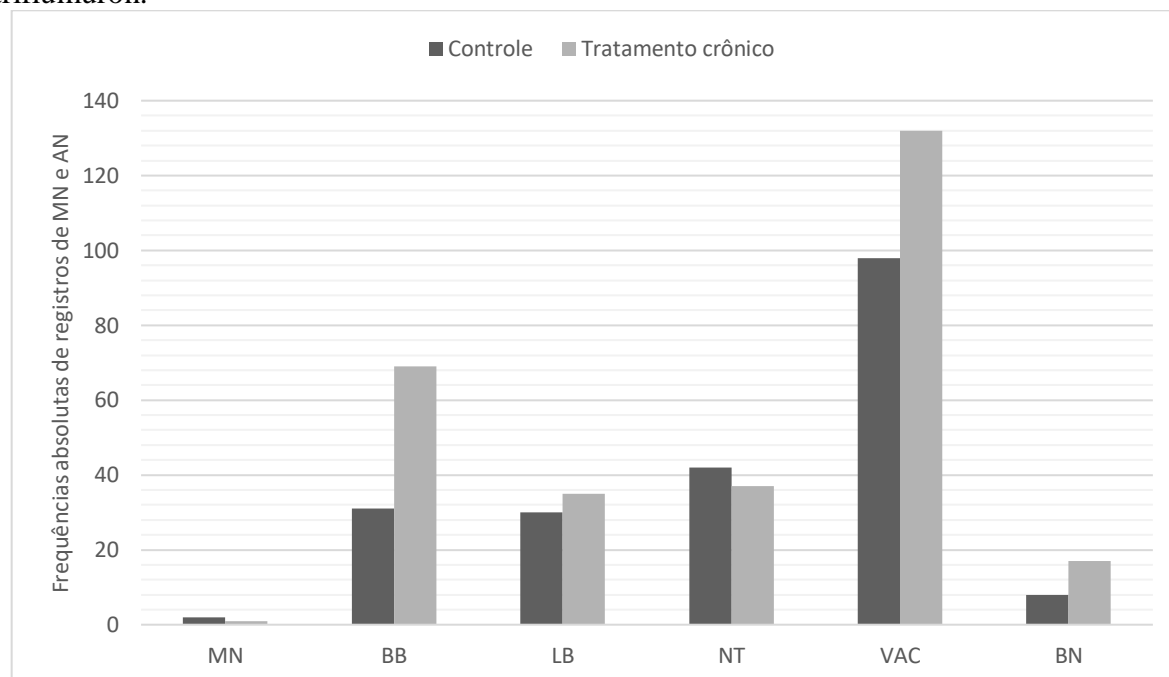
Os resultados do presente estudo foram obtidos principalmente por meio dos peixes expostos cronicamente ao Certero® e dos peixes do aquário de controle. Durante o período de teste dos tratamentos crônico e controle, não foi registrada nenhuma morte dos animais testados e o comportamento dos mesmos (mobilidade) ficou dentro do considerado normal para a espécie. As análises dos parâmetros da água para os testes agudos e crônico, bem como do aquário de controle estão disponíveis na Tabela 1. Os dados de tratamento crônico com o inseticida e controle, estão disponíveis na Figura 4 e Tabela 2. Na tabela 2, pode-se verificar as médias de registros obtidos por meio das análises microscópicas. As médias se referem ao total de registros tanto de MN quanto de AN, divididas pelo número de peixes amostrados em cada aquário (n = 10).

Tabela 1 - Parâmetros da água nos aquários de controle, teste crônico e agudos. Laboratório de Genética, UFFS campus de Cerro Largo - RS, 2018.

Característica	Controle*	TC 0,2 mL/L*	TA 0,2 mL/L**	TA 0,6 mL/L**	TA 1,8 mL/L**
pH	7,9 ± 0,04	7,7 ± 0,04	8,1	8,3	8,3
Condutividade (µS)	427 ± 5,2	470 ± 7,3	306	303	354
Sólidos dissolvidos totais (ppm)	282,4 ± 3,4	312,1 ± 4,1	203	199	234
Salinidade (ppm)	218,1 ± 3,8	236,7 ± 3,1	155	152	177
Temperatura (°C)	24,2 ± 0,2	23,6 ± 0,2	26	26	26
O₂ dissolvido (mg/L)	5,0 ± 0,1	5,1 ± 0,1	3,2	3,6	3,6

Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: TC = tratamento crônico; TA = tratamento agudo. *Parâmetros da água dos grupos de experimentação expressos em média ± erro padrão. **Os dados dos testes agudos referem-se somente a uma única medição, por isso não há média e erro padrão.

Figura 4 - Frequências absolutas de micronúcleos e anormalidades nucleares registradas em 20.000 eritrócitos (por aquário) de *zebrafish* mantidos no controle e tratamento crônico com triflumuron.



Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: MN = micronúcleo; BB = *blebbed*; LB = *lobed*; NT = *notched*; VAC = vacúolo; BN = célula binucleada.

Tabela 2 – Médias dos valores de ocorrência de micronúcleos e anormalidades nucleares em *zebrafish* no aquário de controle e aquário de tratamento, no Laboratório de Genética da UFFS campus de Cerro Largo – RS, em 2018.

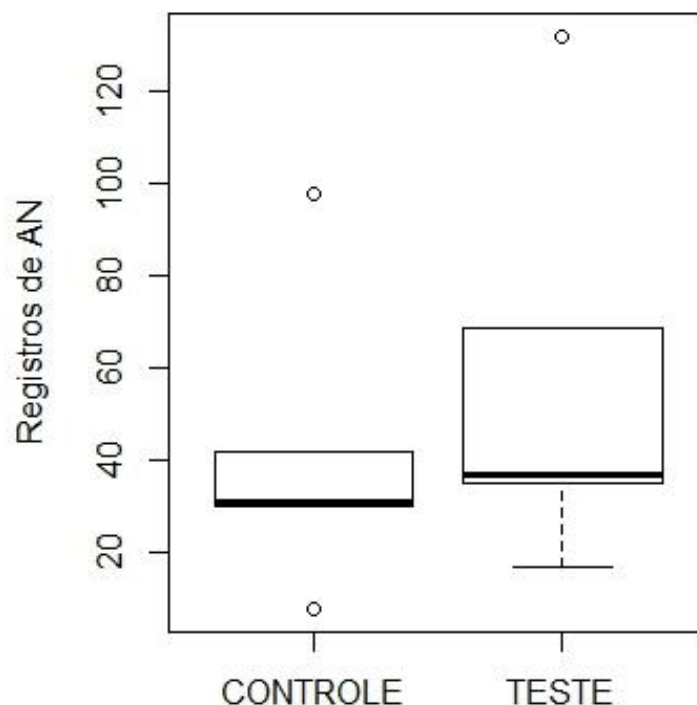
Aquário	MN*	BB*	LB*	NT*	VAC*	BN*
Controle	0,2 ± 0,1	3,1 ± 0,4	3,0 ± 0,6	4,2 ± 1,0	9,8 ± 2,2	0,8 ± 0,4
Tratamento	0,1 ± 0,1	6,6 ± 2,1	3,5 ± 0,9	3,7 ± 1,2	10,3 ± 3,6	1,7 ± 0,4

Fonte: Elaborado pelo autor. *Dados hematológicos dos grupos de experimentação expressos em média ± erro padrão. Legenda: MN= micronúcleo; BB = *blebbed*; LB = *lobed*; NT = *notched*; VAC = vacúolo; BN = célula binucleada.

O Teste de Wilcoxon (equivalente ao Teste U de Mann-Whitney) realizado tanto para MN, quanto para AN, não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$), indicando assim, que provavelmente, o triflumuron nas doses recomendadas e em longo período de tempo não influencia no aumento da frequência da presença desses fenômenos nas células sanguíneas desses animais.

Nos peixes submetidos cronicamente ao triflumuron, contudo, pode-se verificar que a variação em relação à mediana de números de ocorrências totais de AN é maior que no aquário sem o inseticida (Fig. 5). Entretanto, o teste estatístico usado não mostrou evidências suficientes de que a ocorrência de AN estavam relacionadas à presença do inseticida na água.

Figura 5 - Variação de registros de anormalidades nucleares encontradas nos dois grupos de *zebrafish* do estudo, no Laboratório de Genética, UFFS campus de Cerro Largo - RS, em 2018.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos testes agudos realizados, os três grupos de peixes usados nessa exposição morreram em até 24 horas depois de iniciado o teste. Os animais expostos nas concentrações mais altas do que a recomendada do inseticida estudado (0,6 mL/L e 1,8 mL/L), morreram em menos de uma hora após o início da exposição. O grupo de teste agudo que teve sua morte mais lenta foi o grupo exposto na concentração de campo (0,2 mL/L), a mesma usada para o teste crônico. Este grupo resistiu por volta de 24 horas depois de iniciado o experimento.

4 DISCUSSÃO

De acordo com o exposto neste trabalho, foi possível perceber que o número de MN registrados não foi o suficiente para demonstrar que o triflumuron cause alterações genéticas no organismo-modelo usado em exposição crônica ao triflumuron. As AN também não foram estatisticamente significativas, apesar da frequência de algumas categorias analisadas terem sido maiores no grupo de peixes do tratamento com o inseticida.

O teste de micronúcleo é amplamente usado para a avaliação de impacto de diferentes compostos sobre células de organismos vivos, inclusive usado por empresas para avaliar o risco de genotoxicidade de seus produtos (CARVALHO et al., 2017). É um teste seguro e de rápida execução, que pode informar sobre o perigo que determinados produtos podem oferecer à saúde humana e organismos não-alvo.

A taxa de formação de MN foi baixa tanto no experimento de controle, como na exposição crônica ao Certero®. Os poucos MN registrados nos dois grupos de peixes amostrados ficaram dentro da taxa basal de formação de MN, que é da ordem de 3/1000 células examinadas (MÉLO et al., 2008). Assim, a partir deste estudo, de estudos preliminares já realizados com o gênero *Astyanax* (JABLONSKI et al., 2017) e a informação da própria bula do produto, que informa que o composto não induz a formação de MN em animais de laboratório, pode-se inferir que, provavelmente, na exposição controlada e na dose recomendada, esse composto não aumenta a frequência de formação de danos citogenéticos em células de seres vivos não-alvos.

Embora o escopo do presente estudo ter sido a avaliação dos danos genéticos que o triflumuron poderia causar em seres vivos não-alvo para a substância, também pôde-se verificar que a substância pode ser letal quando usada em doses elevadas em curto período de tempo. Os testes agudos realizados servem de alerta para a verdadeira concentração letal mediana do produto.

O registro da mortalidade total de peixes de dois aquários em um período de até uma hora após o início do experimento agudo, evidenciam de que a concentração letal mediana (CL₅₀) estipulada na Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ) Mirza 480 SC® – outro inseticida disponível comercialmente por outra fabricante e que possui a mesma formulação do Certero® – deve ser menor, visto que as doses que foram usadas em nosso estudo foram menores diante da recomendada para matar 50% dos animais. A CL₅₀ estipulada de Mirza 480 SC®, para peixes da espécie *Danio rerio* é de > 100 mg/L (Certero® em sua FISPQ não possui a CL₅₀ para peixes). Dessa forma, apesar dos resultados negativos no

teste crônico de genotoxicidade, deve-se ter atenção ao uso indiscriminado de inseticidas, visto que frequentemente, agricultores não fazem o uso da leitura da bula e, muitas vezes, o uso de agrotóxicos é feito grosseiramente, sendo utilizado em concentrações maiores do que as recomendadas pela fabricante (BARBOSA, 2014).

Ainda em relação aos testes agudos, poderia se supor que a mortalidade total dos grupos de peixes amostrados em até 24 horas, pode ter sido provocada pela alta descarga do inseticida na água em curto período de tempo, combinado com o fato de que as taxas de oxigênio dissolvido nesses aquários estavam abaixo da recomendada para a espécie (Tab. 1). Contudo, sabe-se que o *zebrafish* é um organismo-teste usado preferencialmente em pesquisa pelo fato de ser um animal resistente e tolerar altas variações ambientais, sendo esse mais um dos motivos pelo qual ele vem se tornando popular no meio acadêmico (DAMSKI, et al., 2011). Além disso, como foi exposto na sessão anterior, os animais que tiveram sua morte mais demorada estavam expostos no aquário com a menor taxa de oxigênio dissolvido e menor concentração do inseticida, o que demonstra que as mortes provavelmente não ocorreram por asfixia.

Muitos trabalhos disponíveis que avaliam o potencial genotóxico de variados compostos confirmam que o teste de micronúcleo é confiável e mostra resultados satisfatórios. Mélo et al. (2008) em seu estudo dos efeitos mutagênicos do inseticida temefós demonstraram que diferentes doses de temefós administradas em ratos por via bucal-gástrica induziram a formação de micronúcleos em 2,61%, 3,50% e 3,69% em animais machos e 1,02%, 1,37% e 1,33% em fêmeas.

Com relação ao teste de micronúcleo písceo, Benites et al. (2014), em um estudo para avaliação do potencial mutagênico das águas do rio Uruguai também registraram diferenças significativas nas frequências de micronúcleos entre os grupos controle e tratamento. Além disso, o uso do *zebrafish* como organismo-modelo é cada vez mais frequente nas pesquisas acadêmicas *in vivo* e traz resultados seguros (D’COSTA et al., 2018). D’Costa et al. (2018) ainda mostraram em seu trabalho que, a presença do pesticida monocrotofós na água é correlacionado com a maior frequência de micronúcleos em eritrócitos de *zebrafish* e é confirmado também com os resultados positivos no teste cometa. Além dos trabalhos citados, atualmente há uma grande quantidade de trabalhos que têm usado peixes para avaliar o potencial mutagênico de substâncias (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; SANT’ANNA, 2009). Dessa forma, nossos resultados evidenciam que a metodologia usada e os resultados são confiáveis.

5 CONCLUSÃO

Por meio deste estudo, verificamos que a concentração recomendada para o uso no campo do triflumuron não influenciou no aumento da frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares nos eritrócitos do *zebrafish* em exposição crônica. Diante disso, podemos inferir que, possivelmente, o uso controlado das doses recomendadas na bula dos produtos comerciais do triflumuron, não causará aumento na frequência de micronúcleos e anormalidades nucleares em peixes.

Contudo, apesar deste estudo não ter apresentado resultados significativos no teste crônico de genotoxicidade, deve-se ter atenção aos resultados em relação aos testes agudos. O uso indiscriminado da substância, em doses mais altas que a recomendada e em pequeno espaço de tempo, podem vir a causar toxicidade e consequente mortalidade de eucariotos não-alvo do produto. Nesse sentido, a Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ) de Mirza 480 SC, provavelmente, pode errar ao afirmar que a dose para causar a morte de metade de uma população de peixes (CL₅₀) precisaria ser bastante elevada. Nosso estudo mostrou que a dose é abaixo da estipulada para causar a morte de metade de uma população desses animais, assim, necessitando de mais estudos de toxicidade para confirmar esse achado.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, L.R. **Uso de agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ao meio ambiente: um estudo com agricultores da microbacia hidrográfica do Ribeirão Arara no município de Paranavaí, PR.** 2014. 42 f. Monografia de Especialização (Pós-Graduação em Gestão Ambiental em Municípios). Medianeira, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014. Disponível em: < http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4523/1/MD_GAMUNI_2014_2_9.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- BELINATO, T.A. **Efeito de triflumuron - um inibidor da síntese de quitina – sobre o desenvolvimento e a reprodução de culicídeos vetores de doenças.** 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: < <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp074234.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- BENITES, L.M.; et al. 2014. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. **Ciência e Natura**, 36: 107-113. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/html/4675/467546173004/>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- BRASIL. Decreto n. 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7.802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 8 jan. 2002. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- BRASIL. Lei n. 7.802, de 12 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 12 jul. 1989. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- CARNEIRO, F.F.; et al. Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: Carneiro FF, et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015, p49-55. Disponível em: < https://www.abrasco.org.br/dossieagrotoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- CARVALHO, L.G.; et al. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, 17: 1-5, 2017. Disponível em: < <http://www.ib.usp.br/revista/node/236>>. Acesso em: 16 nov. 2018.
- CERTERO®. São Paulo, SP: **Bayer S.A.** Bula de inseticida. Disponível em: < <https://www.agro.bayer.com.br/produtos/certero>>. Acesso em: 17 nov. 2018.
- CORT, C.C.W.D.; GHISI, N.C. Uso de alterações morfológicas nucleares em *Astyanax* spp. Para avaliação da contaminação aquática. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, 38: 31-39, 2014. Disponível em: < https://www.saocamilo-sp.br/pdf/mundo_saude/155559/A04.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2018.
- D’COSTA, A.H.; et al. Induction of DNA damage in the peripheral blood of zebrafish (*Danio rerio*) by the agricultural organophosphate pesticide, monocrotophos. **International Aquatic Research**, 10: 243-251, 2018. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s40071-018-0201-x>>. Acesso em 16 nov. 2018.

DAMMSKI, A.P.; et al. **Zebrafish: manual de criação em biotério**. 1ª edição. Curitiba: UFPR, 2011. 107 p. Disponível em: < <https://gia.org.br/portal/wp-content/uploads/2013/06/ZEBRAFISH.pdf.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, U.M. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, 1: 337-340, 2008. Disponível em: < <http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/907>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

HOOFTMAN, R.N.; RAAT, W.K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, 104: 147-152, 1982.

JABLONSKI, C.A.; et al. Genotoxicidade e citotoxicidade em peixes submetidos ao triflumuron utilizado nas culturas no Rio Grande do Sul. In: Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica, 7. Erechim. **Anais...** Erechim: Universidade Federal da Fronteira Sul, 2017, v.1., 2017. Disponível em: < <https://periodicos.uffs.edu.br/index.php/JORNADA/article/view/5640>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

LE BIHANIC, F.; et al. In vivo micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. **Mutagenesis**, 31: 643-653, 2016. Disponível em: < <https://academic.oup.com/mutage/article/31/6/643/2468955>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

MATOZO, F.; et al. Avaliação dos efeitos genotóxicos do fungicida ridomil em *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes). **Luminária**, 17: 121-131, 2015. Disponível em: < <http://periodicos.unespar.edu.br/index.php/luminaria/article/view/522>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

MÉLO, M.E.B.; et al. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 67: 196-201, 2008. Disponível em: < <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v67n3/a06v67n3.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

MIRZA 480 SC. Campinas, SP. **Rotam**. 2017. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico. Disponível em: < http://alamosbrasil.com.br/wp-content/uploads/2015/11/Mirza_480_SC_FISPO.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2018.

RIVERO, C.L.G. **Perfil da frequência de micronúcleos e de danos no DNA de diferentes espécies de peixes no Lago Paranoá, Brasília – DF, Brasil**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, 2007. Disponível em: < http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/2626/1/2007_CarlaLeticiaGedielRivero.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.

SANT'ANNA, M.C.B. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro**. 2009. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: < <http://repositorio.pucrs.br/dspace/handle/10923/1450>>. Acesso em: 16 nov. 2018.

SCHMID, W. The micronucleus test. Amsterdã: **Mutations Research**, 31: 9-15, 1975.

SILVEIRA, T.R.; SCHNEIDER, A.C.; HAMMES, T.O. *Zebrafish*: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**. v.64, n.2, São Paulo, 2012. Disponível em: < http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252012000200002>. Acesso em: 16 nov. 2018.

THOMÉ, R.G.; et al. Avaliação de genotoxicidade da água de um rio urbano utilizando estudo de células sanguíneas de *Danio rerio*. **Revista Conexão Ciência**, 11: 9-16, 2016. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/Ralph_Thome/publication/311665042_Avaliacao_de_Genotoxicidade_da_Agua_de_um_Rio_Urbano_Utilizando_Estudo_de_Celulas_Sanguineas_de_Danio_rerio_Assessment_of_water_genotoxicity_from_an_urban_river_using_study_of_Danio_rerio_blood_cells/links/5852c06908ae0c0f3222710a/Avaliacao-de-Genotoxicidade-da-Agua-de-um-Rio-Urbano-Utilizando-Estudo-de-Celulas-Sanguineas-de-Danio-rerio-Assessment-of-water-genotoxicity-from-an-urban-river-using-study-of-Danio-rerio-blood-cells.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2018.

WHO. Pesticides and their application : for the control of vectors and pests of public health importance, 6th ed. Geneva: **World Health Organization**, 2006. Disponível em: < <http://apps.who.int/iris/handle/10665/69223>>. Acesso em: 02 dez. 2018.